

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610041751.3

[51] Int. Cl.
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 21/31 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年12月23日

[11] 授权公告号 CN 100573151C

[22] 申请日 2006.1.28

[21] 申请号 200610041751.3

[73] 专利权人 中国人民解放军第四军医大学

地址 710032 陕西省西安市长乐西路 17
号第四军医大学基础部免疫学教研室

[72] 发明人 金伯泉 徐竹蔚 宋朝君

[56] 参考文献

CN1548958A 2004.11.24

WO2004/043237A2 2004.5.27

SARS 冠状病毒 NS 融合蛋白的重组表达纯化与免疫学性质分析. 贾奴静等. 中国生物化学与分子生物学, 第 21 卷第 6 期. 2005

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 西安慈源有限责任专利事务所
代理人 鲍燕平

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的定量检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种利用双抗体夹心酶联免疫吸附试验来定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的方法, 其定量检测方法是: 它利用在制备抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶单克隆抗体的基础上, 经过配对抗体的筛选, 建立的双抗体夹心酶联免疫吸附试验, 来定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶。为了克服免疫印迹法的不足, 本发明提供一种麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的定量检测方法, 它不仅可以定量检测, 而且特异性强、灵敏度高、重复性好、简便易行, 非常适合于快速定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶及相应的融合蛋白。

1、麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的定量检测方法，其定量检测方法是：在制备抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶单克隆抗体的基础上，经过配对抗体的筛选，建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验，来定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶；单克隆抗体的制备和双抗体夹心酶联免疫吸附试验的建立，是指将麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶作为免疫原，采用常规杂交瘤技术得到抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的单克隆抗体，并常规标记辣根过氧化物酶，分别将未标记的单克隆抗体作为包被抗体，将标记的单克隆抗体作为酶标抗体，采用阵列法两两配对挑选敏感性最高且特异性最好的配对抗体，建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验的系统；双抗体夹心酶联免疫吸附试验的方法是在 96 孔板中，加入 5mg/L 包被抗体，24 小时后用含牛血清白蛋白的缓冲液封闭 96 孔板，洗涤后加入待测标本和倍比稀释的麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶标准品，孵育及洗涤后加入酶标抗体，再次孵育及洗涤后以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色，于波长 410nm 测定光吸收值，以麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶标准品的光吸收值为纵坐标，相应浓度为横坐标，作标准曲线，根据待测标本的光吸收值，经曲线拟合或换算，得出待测标本中麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的浓度。

麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的定量检测方法

技术领域

本发明涉及一种利用双抗体夹心酶联免疫吸附试验来定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的方法。

背景技术

随着“人类基因组计划”的完成，人类已经进入“功能基因组计划”，其中首当其冲的就是蛋白质组学的研究。蛋白质结构和功能的多样性决定了蛋白质组学研究的难度是基因研究所无法比拟的，尤其是新基因所编码的蛋白质的结构和功能的揭示对生物学家来说是极富挑战性的。而在蛋白组学的研究领域中，标签蛋白是一种重要的工具。已有大量的试验表明，应用适当的融合标签，可以增加目的基因表达产物(即目的蛋白)的稳定性，使目的蛋白易于检测和纯化，增加表达水平，提高可溶性，并能帮助目的蛋白保留天然构像及与配体结合的能力。常见的标签包括：多聚精氨酸、多聚组氨酸、钙调蛋白结合多肽、c-myc、谷胱甘肽 S 转移酶、FLAG 多肽、葡萄球菌蛋白 A、麦芽糖结合蛋白、硫氧化还原蛋白等，而麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶是其中最为常用的标签。含麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的融合蛋白表达后，需要定性和定量的检测。目前对麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的检测方法主要是免疫印迹法，它操作复杂、实验过程较长，一般需 2 天，用的试剂较贵，每次试验要几百元，并且只是一种定性的方法。

发明内容

为了克服免疫印迹法的不足，本发明提供一种麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的定量检测方法，它不仅可以定量检测，而且特异性强、灵敏度高、重复性好、简便易行，非常适合于快速定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶及相应的融合蛋白。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：提供一种麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的定量检测方法，其特征是：它利用在制备抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶单克隆抗体的基础上，经过配对抗体的筛选，建立的双抗体夹心酶联免疫吸附试验，来定量检测

麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶。

所述的定量检测方法包括：抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的单克隆抗体的制备和配对抗体的筛选、以及双抗体夹心酶联免疫吸附试验的建立。

所述的抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶单克隆抗体的制备和配对抗体的筛选方法是将麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶作为免疫原，采用常规杂交瘤技术得到抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的单克隆抗体，并分别常规标记辣根过氧化物酶，分别将未标记的单克隆抗体作为包被抗体，将标记的单克隆抗体作为酶标抗体，采用阵列法两两配对挑选敏感性最高且特异性最好的配对抗体。

所述的双抗体夹心酶联免疫吸附试验的方法是在 96 孔板中，顺序加入包被抗体、待测标本和标准品、酶标抗体及底物，于波长 410nm 测定光吸收值，将上述挑选的最好的一对抗体分别用作包被抗体和酶标抗体来检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶，用 5mg/L 包被抗体包被 96 孔板，24 小时后用含牛血清白蛋白的缓冲液封闭 96 孔板，洗涤后加入待测标本和倍比稀释的麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶标准品，孵育及洗涤后加入酶标抗体，再次孵育及洗涤后以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色，于波长 410nm 测定光吸收值，以标准品的光吸收值为纵坐标，相应浓度为横坐标，作标准曲线，根据待测标本的光吸收值，经曲线拟合或换算，得出待测标本中麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的浓度。

本发明的有益效果是，它可以快速定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶，因为这是在单克隆抗体基础上建立的方法，而单克隆抗体是识别单一表位的抗体，所以本发明的特异性强；又因为经过抗体的配对筛选，所以本发明的灵敏度高；本发明是建立在酶联免疫吸附试验的基础上的，免疫印迹整个过程约需2天，而本发明只需先用5分钟左右包被抗体，放到冰箱24小时后做后面一半，后面一半约4个小时，且各复孔间的光吸收值间误差极小，所以本发明还有简便易行、重复性好的特点。

具体实施方式

抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶单克隆抗体的制备是：将麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶作为免疫原，采用常规杂交瘤技术得到抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶

的单克隆抗体。

配对双抗体的筛选方法是：将得到的单克隆抗体分别常规标记辣根过氧化物酶，分别将未标记的单克隆抗体作为包被抗体，将标记的单克隆抗体作为酶标抗体，采用阵列法两两配对挑选最好条件的配对抗体，建立双抗体夹心酶联免疫吸附试验的系统。最好条件的配对抗体的挑选方法是：选择敏感性最高，即检测相同浓度的麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶的光吸收值最高，且特异性高（即检测无关蛋白的光吸收值最低，也即非特异本底最低）的配对抗体。

实施例 1 定量检测麦芽糖结合蛋白的方法：

将麦芽糖结合蛋白作为免疫原，采用常规杂交瘤技术，经细胞融合、筛选及克隆化，共得到 14 株抗麦芽糖结合蛋白的单克隆抗体，分别命名为 FMU-MBP1~FMU-MBP14。

经过抗体的配对筛选后，将 FMU-MBP12 作为包被抗体，而将 FMU-MBP4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液稀释包被抗体 FMU-MBP12 至 5mg/L，加入 96 孔板，100 μl /孔，保湿，4 $^\circ\text{C}$ 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板 3 次，加入含 0.3%牛血清白蛋白的缓冲液，室温封闭 30 分钟。洗板 3 次，加入待测标本和倍比稀释的麦芽糖结合蛋白标准品，100 μl /孔，37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时。洗板 3 次，加入 1:300 稀释的酶标抗体 FMU-MBP4，100 μl /孔，37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 小时。洗板 3 次，以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色，100 μl /孔，37 $^\circ\text{C}$ 放置 5 分钟，于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标，相应浓度为横坐标，作标准曲线，其灵敏度达 31.3 ng/mL。根据待测标本的光吸收值，经曲线拟合，得出待测标本中麦芽糖结合蛋白的浓度为 596.3 ng/mL。标准品，即已知浓度的用来免疫小鼠的免疫原。

实施例 2 定量检测含麦芽糖结合蛋白的融合蛋白 MBP-RPMS1 的方法：

将麦芽糖结合蛋白作为免疫原，采用常规杂交瘤技术，经细胞融合、筛选及克隆化，共得到 14 株抗麦芽糖结合蛋白的单克隆抗体，分别命名为 FMU-MBP1~FMU-MBP14。

经过抗体的配对筛选后，将 FMU-MBP12 作为包被抗体，而将 FMU-MBP4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 缓冲液稀释包被抗体

FMU-MBP12 至 5mg/L, 加入 96 孔板, 100 μ l/孔, 保湿, 4 $^{\circ}$ C 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板 3 次, 加入含 0.3%牛血清白蛋白的缓冲液, 室温封闭 30 分钟。洗板 3 次, 加入待测标本和倍比稀释的麦芽糖结合蛋白标准品, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 加入 1:300 稀释的酶标抗体 FMU-MBP4, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟, 于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 作标准曲线。根据待测标本的光吸收值, 经曲线拟合和分子量换算, 得出待测标本中融合蛋白 MBP-RPMS1 的浓度为 303.6 ng/mL。

实施例 3 定量检测谷胱甘肽 S 转移酶的方法:

将谷胱甘肽 S 转移酶作为免疫原, 采用常规杂交瘤技术, 经细胞融合、筛选及克隆化, 共得到 5 株抗谷胱甘肽 S 转移酶的单克隆抗体, 分别命名为 FMU-GST1~FMU-GST5。

经过抗体的配对筛选后, 将 FMU- GST5 作为包被抗体, 而将 FMU- GST4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液稀释包被抗体 FMU-GST5 至 5mg/L, 加入 96 孔板, 100 μ l/孔, 保湿, 4 $^{\circ}$ C 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板 3 次, 加入含 0.5%牛血清白蛋白的缓冲液, 室温封闭 30 分钟。洗板 3 次, 加入待测标本和倍比稀释的谷胱甘肽 S 转移酶标准品, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 加入 1:500 稀释的酶标抗体 FMU- GST4, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次, 以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟, 于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 作标准曲线, 其灵敏度达 15.6 ng/mL。根据待测标本的光吸收值, 经曲线拟合, 得出待测标本中谷胱甘肽 S 转移酶的浓度为 145.6ng/mL。

实施例 4 定量检测含谷胱甘肽 S 转移酶的融合蛋白 GST-ID2 的方法:

将谷胱甘肽 S 转移酶作为免疫原, 采用常规杂交瘤技术, 经细胞融合、筛选及克隆化, 共得到 5 株抗谷胱甘肽 S 转移酶的单克隆抗体, 分别命名为 FMU-GST1~FMU-GST5。

经过抗体的配对筛选后, 将 FMU- GST5 作为包被抗体, 而将 FMU- GST4 标记辣根过氧化物酶后作为酶标抗体。用 pH9.6、0.05mol/L 的 Na₂CO₃-NaHCO₃ 缓冲液稀释包被抗体 FMU-GST5 至 5mg/L, 加入 96 孔板, 100 μ l/孔, 保湿, 4 $^{\circ}$ C 放置 24 小时。用洗涤缓冲液洗 96 孔板

3 次，加入含 0.5%牛血清白蛋白的缓冲液，室温封闭 30 分钟。洗板 3 次，加入待测标本和倍比稀释的谷胱甘肽 S 转移酶标准品，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次，加入 1:500 稀释的酶标抗体 FMU- GST4，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。洗板 3 次，以 2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻吡咯啉-磺酸)底物显色，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 放置 5 分钟，于波长 410nm 测定光吸收值。以标准品的光吸收值为纵坐标，相应浓度为横坐标，作标准曲线。根据待测标本的光吸收值，经曲线拟合和分子量换算，得出待测标本中融合蛋白 GST-ID2 的浓度为 250.1 ng/mL。

专利名称(译)	麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽S转移酶的定量检测方法		
公开(公告)号	CN100573151C	公开(公告)日	2009-12-23
申请号	CN200610041751.3	申请日	2006-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第四军医大学		
[标]发明人	金伯泉 徐竹蔚 宋朝君		
发明人	金伯泉 徐竹蔚 宋朝君		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N21/31		
其他公开文献	CN1825117A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种利用双抗体夹心酶联免疫吸附试验来定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽S转移酶的方法，其定量检测方法是：它利用在制备抗麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽S转移酶单克隆抗体的基础上，经过配对抗体的筛选，建立的双抗体夹心酶联免疫吸附试验，来定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽S转移酶。为了克服免疫印迹法的不足，本发明提供一种麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽S转移酶的定量检测方法，它不仅可以在定量检测，而且特异性强、灵敏度高、重复性好、简便易行，非常适合于快速定量检测麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽S转移酶及相应的融合蛋白。